



FR04/3308

REC'D 04 MAR 2005	
WIPO	PCT

# BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

## COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 27 DEC. 2004

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

DOCUMENT DE  
PRIORITÉ  
PRÉSENTÉ OU TRANSMIS  
CONFORMÉMENT À LA RÈGLE  
17.1. a) OU b)

BEST AVAILABLE COPY

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint-Petersbourg  
75800 PARIS cedex 08  
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04  
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23  
www.inpi.fr



26 bis, rue de Saint Pétersbourg - 75800 Paris Cedex 08

Pour vous informer : INPI DIRECT

08 825 83 85 87

0,15 € TTC/mn

Télécopie : 33 (0)1 53 04 52 65

19 DEC 2003 Réserve à l'INPI

# BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

N° 11354\*03

## REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

page 1/2



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

08 540 0 W / 030103

<b>REMISE DES PIÈCES</b> DATE <b>19 DEC 2003</b> <b>INPI LYON</b> LIEU <b>0314995</b> N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI <b>19 DEC. 2003</b>		<b>NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE</b>  KERNEIS Danièle Direction de la Propriété Intellectuelle AVENTIS PASTEUR 2, avenue pont Pasteur 69007 LYON	
<b>Vos références pour ce dossier</b> (facultatif) PM 0308			
<b>Confirmation d'un dépôt par télécopie</b>		<input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie	
<b>2 NATURE DE LA DEMANDE</b>		<b>Cochez l'une des 4 cases suivantes</b>	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
Demande de brevet initiale		N° _____ Date _____	
ou demande de certificat d'utilité initiale		N° _____ Date _____	
Transformation d'une demande de brevet européen		N° _____ Date _____	
<b>3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)</b> Composition immunostimulante			
<b>4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE</b>		Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ Pays ou organisation _____ N° _____ <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
<b>5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)</b>		<input type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique	
Nom ou dénomination sociale		AVENTIS PASTEUR	
Prénoms			
Forme juridique		S.A.	
N° SIREN		3 4 9 5 0 5 3 7 0	
Code APE-NAF		2 4 4 c	
Domicile ou siège	Rue	2, avenue pont Pasteur	
	Code postal et ville	6 9 0 0 7 LYON	
	Pays	France	
Nationalité		Française	
N° de téléphone (facultatif)		04 37 37 70 90 N° de télécopie (facultatif) 04 37 37 78 50	
Adresse électronique (facultatif)			
		<input type="checkbox"/> S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	

Remplir impérativement la 2<sup>ème</sup> page

**BREVET D'INVENTION  
CERTIFICAT D'UTILITÉ**

**REQUÊTE EN DÉLIVRANCE**  
page 2/2

**BR2**

13 DEC 2003  
REMISE DES PIÈCES  
DATE 69 INPI LYON  
LIEU 0314995  
N° D'ENREGISTREMENT  
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

DB 540 W / 210502

<b>6 MANDATAIRE (s'il y a lieu)</b>	
Nom	KERNEIS
Prénom	Danièle
Cabinet ou Société	AVENTIS PASTEUR
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel	PG 8926
Adresse	Rue 2, avenue pont Pasteur
	Code postal et ville 69 10 10 17 LYON
	Pays France
N° de téléphone (facultatif)	04 37 37 70 90
N° de télécopie (facultatif)	04 37 37 78 50
Adresse électronique (facultatif)	
<b>7 INVENTEUR (S)</b>	
Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques	
Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes	<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)
<b>8 RAPPORT DE RECHERCHE</b>	
Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)	
Établissement immédiat ou établissement différé	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Paiement échelonné de la redevance (en deux versements)	Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non
<b>9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES</b>	
Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence) : AG <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
<b>10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS</b>	
<input type="checkbox"/> Cochez la case si la description contient une liste de séquences	
Le support électronique de données est joint	<input type="checkbox"/>
La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe	<input type="checkbox"/>
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes	
<b>11 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)</b> KERNEIS Danièle	
<b>VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI</b>	

L'invention est relative au domaine des compositions immunostimulantes comprenant au moins un agoniste du récepteur Toll-like 7 ou du récepteur Toll-like 8 qui sont  
5 présents sur les cellules présentatrices d'antigènes. Plus particulièrement, l'invention concerne des compositions qui comprennent en outre un agoniste du récepteur Toll-like 4, et notamment de telles compositions qui comprennent en outre un antigène vaccinal. Il est connu dans l'art antérieur de vouloir augmenter ou orienter la réponse immunitaire induite par les antigènes présents dans un vaccin, au moyen d'adjuvants qui sont choisis  
10 dans la catégorie des immunostimulants. Ceci peut être souhaitable car l'antigène, administré seul, n'est pas suffisamment immunogène, à cause notamment de son très haut degré de pureté, ou parce qu'on souhaite réduire la quantité d'antigènes présents dans le vaccin ou le nombre de rappels à effectuer, ou encore parce qu'on souhaite allonger la durée de protection conférée par le vaccin. Parfois, il s'agit de modifier  
15 qualitativement plutôt que quantitativement la réponse induite. De nombreuses molécules ont déjà été décrites en relation avec leurs propriétés adjuvantes ; cependant, les principaux adjuvants actuellement commercialisés dans les vaccins sont des adjuvants à base d'aluminium ou des émulsions. Ainsi, parmi l'art antérieur connu, on peut notamment citer le brevet EP636031, qui  
20 divulgue l'utilisation d'une 1H-imidazo[4,5c]quinoléine-4-amine comme adjuvant vaccinal, vis-à-vis d'une glycoprotéine du virus Herpes Simplex 2 chez le cobaye. Dans ce document, le vaccin administré ne permet pas d'empêcher complètement le développement de la maladie, lors d'un challenge des animaux par du virus HSV2, mais il permet de réduire les lésions, l'excrétion vaginale du virus ainsi que le phénomène de  
25 récurrence de la maladie. Selon la publication intitulée « *Adjuvant activities of Immune Response Modifier R848 : Comparison with CpG ODN* », de Vasilakos et al, dans Cellular Immunology 204, 64-74 (2000), le dérivé d'imidazoquinoléine R-848 est décrit pour être un adjuvant de type TH1, dans un test utilisant comme antigène l'ovalbumine administrée à des souris.  
30 Cette publication décrit également un autre type d'adjuvant vaccinal constitué par des oligonucléotides comprenant un dinucléotide CG, dans lequel la cytosine n'est pas méthylée.

Dans un autre document de l'art antérieur constitué par la publication intitulée "*Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848*" de Jurk et al, dans Nature Immunology, June 2002, volume 3 n°6, p499, il est indiqué que les récepteurs Toll-like jouent un rôle important dans les réponses immunes aux pathogènes, le récepteur Toll-like 9 étant activé par l'ADN bactérien ayant des motifs CpG non méthylés, alors que le R-848 active les cellules via le récepteur Toll-like 7 et le récepteur Toll-like 8.

Dans la publication intitulée « *Novel synthetic LPS receptor agonists boost systemic and mucosal antibody responses in mice* », de Przetak et al, dans Vaccine 21 (2003) pages 961-970, il est décrit des composés chimiques ayant des chaînes d'acides gras, composés dépourvus de noyaux sucre mais qui ont une activité adjuvante vis-à-vis d'antigènes constitués par la toxine tétanique ou l'ovalbumine. Ces composés sont connus pour activer un mécanisme d'action lié au récepteur Toll-like 4.

Tous ces composés sont connus pour avoir, individuellement, des propriétés immunostimulantes à des degrés divers selon les conditions d'administration; cependant, il reste souhaitable de pouvoir disposer d'une composition permettant de potentialiser ces propriétés immunostimulantes, en particulier dans le cas de l'administration d'un antigène vaccinal.

Pour atteindre cet objectif la présente invention a pour objet une composition immunostimulante comprenant au moins un agoniste du récepteur Toll-like 7 ou du récepteur Toll-like 8, caractérisée en ce qu'elle comprend également un agoniste du récepteur Toll-like 4.

Ainsi, on obtient une potentialisation de la réponse immunostimulante.

Selon un mode particulier de mise en œuvre de l'invention, l'agoniste du récepteur Toll-like 7 ou du récepteur Toll-like 8 est un composé différent de l'agoniste du récepteur Toll-like 4.

Selon un mode de réalisation particulier, la composition immunostimulante comprend en outre au moins un antigène vaccinal. Ainsi, la réponse immune induite vis-à-vis de l'antigène est potentialisée.

Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, l'agoniste de récepteur Toll-like 7 ou du récepteur Toll-like 8 est un dérivé d'imidazoquinoléine amine. Un tel agoniste peut être obtenu par synthèse chimique pure et présente donc toutes les garanties de reproductibilité et de sécurité nécessaire à un usage pharmaceutique.

Selon un mode particulier de réalisation, le dérivé d'imidazoquinoléine amine est le 4-amino-2-ethoxymethyl- $\alpha, \alpha$ , diméthyl-1-H-imidazo[4,5c]quinoléine-1-ethanol.

Selon un mode de réalisation, l'agoniste du récepteur Toll-like 4 est un composé décrit dans la demande WO0044758, et notamment le ER804057 ; un tel composé, obtenu par  
5 pure synthèse chimique présente également toutes les garanties de reproductibilité et de sécurité nécessaire à un usage pharmaceutique.

De nombreux autres avantages de la présente invention apparaîtront à la lumière de la description détaillée qui va suivre, en référence aux figures 1 à 4 qui illustrent les résultats obtenus à l'exemple 5.

10 La présente invention est relative à une composition immunostimulante ; par composition immunostimulante, on entend une composition susceptible d'induire la maturation ou l'activation de cellules du système immunitaire, telles que les cellules dendritiques, ce qui conduit alors à l'expression sur les cellules de certains marqueurs (CD25, CD80, CD83 ou autres) que l'on peut détecter, et à la sécrétion de cytokines (IL6,  
15 IL12p70, TNF- $\alpha$ ,...) que l'on peut doser.

Selon un mode particulier de réalisation, la composition immunostimulante de l'invention comprend au moins un antigène vaccinal. Par antigène vaccinal, on entend un antigène susceptible d'induire une réponse du système immunitaire lorsqu'il est administré à l'homme ou à un animal. Cette réponse du système immunitaire peut se  
20 traduire par une production d'anticorps ou par une activation de certaines cellules, notamment les cellules présentatrices d'antigènes (ex : les cellules dendritiques), les lymphocytes T, les lymphocytes B.

La composition vaccinale peut être une composition à visée prophylactique ou à visée thérapeutique, ou encore les deux.

25 Elle peut être administrée par toutes les voies habituellement utilisées ou préconisées pour les vaccins : voie parentérale, voie muqueuse, et se présenter sous diverses formes : liquide injectable ou pulvérisable, formulation lyophilisée ou séchée par atomisation ou à l'air,...etc. Elle peut être administrée au moyen d'une seringue ou au moyen d'un injecteur sans aiguille pour injection intramusculaire, sous-cutanée ou intradermique.

30 Elle peut aussi être administrée grâce à un nébuliseur capable de délivrer une poudre sèche ou un spray liquide au niveau des muqueuses, qu'elles soient nasales, pulmonaires, vaginales ou rectales.

Les antigènes vaccinaux utilisés dans les compositions vaccinales selon la présente invention sont des antigènes « directs », c'est-à-dire qu'il ne s'agit pas d'ADN codant pour ces antigènes, mais les antigènes eux-mêmes ; il peut s'agir d'un germe entier ou seulement d'une partie de ce germe ; ainsi parmi les antigènes utilisés habituellement

5 dans les vaccins, on peut notamment citer :

- les polysaccharides, qu'ils soient seuls ou conjugués à des éléments porteurs, tels que les protéines porteuses,
- les germes entiers vivants atténués,
- les germes inactivés,
- 10 - les peptides et protéines recombinants,
- les glycoprotéines, les glycolipides, les lipopeptides,
- les peptides synthétiques,
- les germes éclatés dans le cas de vaccins appelés vaccins « splittés ».

Ces antigènes sont des antigènes utilisés ou susceptibles d'être utilisés pour le traitement

15 ou la prévention de diverses maladies telles que par exemple : diphtérie, tétanos, polio, rage, coqueluche, hépatites A, B, C, fièvre jaune, fièvre typhoïde, varicelle, rougeole, oreillons, rubéole, encéphalite japonaise, méningites, infections à pneumocoques, infections à rotavirus, SIDA, cancers, tuberculose, maladie de Lyme, infections à RSV, herpès, affections bactériennes provoquées par Chlamydia, Neisseria gonorrhoeae, Streptococcus pneumoniae, Moraxella catarrhalis, ou Haemophilus influenza type B, la malaria, les leishmanioses, les listerioses, ...etc.

La composition vaccinale selon l'invention peut être une composition destinée à l'immunisation contre un seul pathogène ou cancer, c'est-à-dire qu'elle comprend un ou plusieurs antigènes d'un seul pathogène ou cancer, ou bien être une composition  
25 destinée à l'immunisation contre plusieurs pathogènes ou cancers (on parle alors de combinaison vaccinale).

Au sens de la présente invention, on entend par agoniste des récepteurs Toll-like 7 et Toll-like 8, un composé capable de se lier à l'un ou l'autre de ces récepteurs ou aux deux et de déclencher la cascade de signalisation associée à ces récepteurs, notamment un  
30 composé capable d'activer la translocation de NF- $\kappa$ B dans des cellules transfectées avec du cDNA codant pour l'un ou l'autre de ces récepteurs, ou pour les deux.

Parmi les agonistes convenant aux fins de l'invention, on peut notamment citer les imidazoquinoléines amines substituées, et notamment celles décrites dans le brevet US

5389640. On a obtenu de particulièrement bons résultats avec le 4-amino-2-ethoxymethyl- $\alpha,\alpha$ , dimethyl-1-H-imidazo[4,5c]quinoline-1-ethanol, encore appelé R-848 dont une méthode de préparation est indiquée aux exemples 99 et 101 de l'USP5389640.

- 5 Au sens de la présente invention, on entend par agoniste du récepteur Toll-like 4, un composé capable de se lier à ce récepteur et de déclencher la cascade de signalisation associée, notamment un composé capable d'activer la translocation de NF- $\kappa$ B dans des cellules transfectées avec du cDNA codant pour ce récepteur.

Parmi les agonistes convenant aux fins de l'invention, on peut citer les LPS des bactéries

- 10 Gram négatives, ou de façon plus appropriée, des dérivés monophosphorylés des lipides A de ces LPS, et notamment, le 3D-MPL ou lipide A monophosphorylé deacylé en position 3 qui est décrit par RIBI dans le brevet UK N°2211502 ainsi que dans l'USP 4436727 et sa Reissue 4912094. Des analogues synthétiques de ces produits, tels que ceux décrits par CORIXA dans la demande WO98/50399, et notamment le RC-529, ou  
15 encore ceux décrits dans la demande WO02/12258 conviennent également. De même, les composés objets des demandes WO95/14026, WO00/00462, WO01/46126 et WO01/46127 au nom de OM Pharma, peuvent convenir.

De façon préférée, on utilise des produits purement synthétiques, dépourvus de noyau saccharidique, tels que ceux décrits dans le brevet USP 6290973 au nom de EISAI CO,

- 20 et en particulier le produit dénommé ER 112066, ou de préférence encore le produit dénommé ER804057. Ce produit est un sel disodique de (1R,6R,22R,27R)-1,27-diheptyl-1,27-bis dodecanoyl -9,19-dihydroxy-9,19-dioxido-14-oxo-6,22-bis[(1,3-dioxotetradecyl)amino]-4,8,10,18,20,24-hexaoxa-13,15-diaza-9,19-diphosphoheptacosane qui peut être obtenu en suivant la méthode de préparation  
25 indiquée dans la demande de brevet WO0044758, pour le composé N° 50, i.e. la méthode décrite à la page 32, à condition de remplacer auparavant dans l'étape menant du produit 39 au produit 41 décrite à la page 28 de la demande de brevet, le chlorure de myristoyl par de l'acide alpha-ketomyristique en présence de EDC (c'est-à-dire de l'hydrochlorure de 1-(3-diméthylaminopropyl)-3-éthylcarbodiimide).

30

Chacun de ces agonistes, que ce soit l'agoniste du récepteur Toll-like 4 ou l'agoniste des récepteurs Toll-like 7 et 8 est connu pour avoir des propriétés immunostimulantes.



L'intérêt de la présente invention est que la réponse observée dans le cadre de la présente invention est une réponse potentialisée. Si l'obtention d'une telle potentialisation pourrait pour une personne non familière avec le domaine de l'immunologie apparaître au 1<sup>er</sup> abord comme évidente, il faut au contraire la considérer  
5 comme surprenante dans le domaine particulier de l'invention ; en effet, les expériences ont montré que, lorsque 2 ou plusieurs immunostimulants sont présents dans une même composition, il est fréquent que l'effet produit par l'un d'entre eux soit inhibiteur vis-à-vis de l'autre ou des autres immunostimulants présents, ou du moins lorsqu'un produit exerce un effet immunostimulant, il est difficile d'augmenter encore la réponse déjà  
10 obtenue.

Dans les tests d'immunostimulation in vitro, on observe une synergie des effets des immunostimulants mis au contact des cellules du système immunitaire qui induisent un niveau d'activation des cellules tout à fait exceptionnel, qui ne pouvait être anticipé à partir du niveau d'activation induit par chacun des immunostimulants utilisé séparément.

15 De même, la synergie observée dans la réponse obtenue lorsque la composition immunostimulante comprend des antigènes vaccinaux, notamment en ce qui concerne le nombre de sujets répondeurs avec un très bon niveau de réponse, est tout à fait exceptionnelle, et ne pouvait nullement être déduite des réponses obtenues avec chacun des adjuvants pris isolément.

20 Les résultats obtenus en utilisant des agonistes de ces récepteurs Toll-like 7, 8 et 4 sont d'autant plus surprenants que des essais réalisés en combinant plusieurs agonistes d'autres récepteurs n'ont abouti à aucune potentialisation des effets observés par chacun des agonistes utilisé isolément.

Les agonistes des récepteurs Toll-like 4, 7 et 8 de la présente invention ont la propriété  
25 d'adjuver les antigènes vaccinaux avec lesquels ils sont administrés, ce qui en général signifie qu'ils sont capables d'accroître ou de modifier la réponse du système immunitaire de l'organisme auquel la composition vaccinale est administrée, par rapport à la réponse qui serait obtenue en leur absence. En particulier, il peut s'agir d'une augmentation de la réponse humorale, ou de la réponse cellulaire, ou des deux. L'action  
30 peut également être, non pas une augmentation de la réponse, mais une orientation différente de la réponse induite : par exemple, orientation vers une réponse cellulaire plutôt qu'une réponse humorale, production de certaines cytokines plutôt que d'autres, production de certains types ou sous-types d'anticorps plutôt que d'autres, stimulation de

certaines cellules plutôt que d'autres, etc... L'action d'un adjuvant peut également consister à augmenter la durée de la réponse immune dans le temps. Il peut aussi s'agir de permettre la diminution du nombre d'administrations nécessaires pour obtenir une protection de l'individu immunisé, ou encore la diminution de la quantité d'antigènes contenue dans la dose administrée.

Dans le cas de la présente invention, la synergie observée se traduit essentiellement par une diminution de la dispersion des résultats obtenus, notamment en ce qui concerne la réponse Th1.

L'action adjuvante des agonistes selon l'invention peut être obtenue, soit lorsqu'ils sont associés à l'antigène ou aux antigènes de la composition vaccinale lors de leur administration, i.e. lorsqu'ils sont présents directement dans la composition vaccinale, ou encore lorsqu'ils sont administrés séparément de l'antigène ou des antigènes dont on veut modifier le pouvoir immunogène. On préfère cependant les utiliser dans la même composition vaccinale que l'antigène ou les antigènes à administrer.

Les exemples qui suivent illustrent des modes de réalisation particuliers de la présente invention.

#### 1. Préparation d'une suspension stock d'agonistes des récepteurs Toll-like 7 et 8.

On dispose de dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) obtenue chez Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL), et de 4-amino-2-ethoxymethyl- $\alpha$ ,  $\alpha$ , dimethyl-1-H-imidazo[4,5c]quinoline-1-ethanol (R-848) fourni par la Société InVivogen.

Ces composés se présentent sous forme de poudre.

342  $\mu$ g de DPPC (0.46  $\mu$ moles) additionnés de 150  $\mu$ g de R-848 (0.51  $\mu$ moles) sont dissous dans 984  $\mu$ l d'un mélange chloroforme/méthanol 4 : 1 (vol/vol). La solution est séchée dans un ballon en verre à l'aide d'un évaporateur rotatif de manière à laisser un film lipidique homogène sur les parois du ballon. Ce film est encore séché sous vide poussé pour éliminer toute trace de solvant résiduel puis repris dans 3 ml d'eau à 60°C. La suspension liposomale résultante est homogénéisée par agitation au vortex, sonication dans un bain à ultrasons puis extrudée séquentiellement, à l'aide d'un extrudeur Lipex thermostaté à 50°C, en un passage à travers une membrane de polycarbonate de porosité 0.8  $\mu$ m, puis un passage à travers une membrane de porosité 0.4  $\mu$ m et enfin un passage à travers une membrane de porosité 0.2  $\mu$ m.

On obtient ainsi des liposomes de DPPC/R-848 (0.9 :1 mol/mol) en eau à 114 µg/ml de DPPC et 50 µg/ml de R-848.

## 2. Préparation d'une suspension stock d'agonistes de récepteur Toll-like 4.

5 On dispose de dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) obtenue chez Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL) et de ER804057 fourni par la Société Eisai .

Ces composés se présentent sous forme de poudre.

273 µg de DPPC (0.37 µmoles) additionnés de 150 µg de ER804057 (0.092 µmoles) sont dissous dans 760 µl d'un mélange chloroforme/méthanol 4 :1 (vol/vol). La solution  
10 est séchée dans un ballon en verre à l'aide d'un évaporateur rotatif de manière à laisser un film lipidique homogène sur les parois du ballon. Ce film est encore séché sous vide poussé pour éliminer toute trace de solvant résiduel puis repris dans 3 ml d'eau à 60°C. La suspension liposomale résultante est homogénéisée par agitation au vortex, sonication dans un bain à ultrasons puis extrudée séquentiellement, à l'aide d'un  
15 extrudeur Lipex thermostaté à 50°C, en un passage à travers une membrane de polycarbonate de porosité 0.8 µm, puis un passage à travers une membrane de porosité 0.4 µm et enfin un passage à travers une membrane de porosité 0.2 µm. On obtient ainsi des liposomes de DPPC/ER804057 (4 :1 mol/mol) en eau à 91 µg/ml de DPPC et 50 µg/ml de ER807057.

20

## 3. Préparation d'une suspension stock d'agonistes de récepteur Toll-like 4 et d'agonistes de récepteurs Toll-like 7 et 8.

On dispose de dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) obtenue chez Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL), de 4-amino-2-ethoxymethyl- $\alpha$ ,  $\alpha$ , dimethyl-1-H-

25 imidazo[4,5c]quinoline-1-ethanol (R-848) fourni par la Société InVivogen, et de ER804057 fourni par la Société Eisai.

Ces composés se présentent sous forme de poudre.

273 µg de DPPC (0.37 µmoles) additionnés de 150 µg de TLA4 (0.092 µmoles) et de 150 µg de R848 (0.51 µmoles) sont dissous dans 1.06 ml d'un mélange  
30 chloroforme/méthanol 4 :1 (vol/vol). La solution est séchée dans un ballon en verre à l'aide d'un évaporateur rotatif de manière à laisser un film lipidique homogène sur les parois du ballon. Ce film est encore séché sous vide poussé pour éliminer toute trace de solvant résiduel puis repris dans 3 ml d'eau à 60°C. La suspension liposomale résultante

est homogénéisée par agitation au vortex, sonication dans un bain à ultrasons puis extrudée séquentiellement, à l'aide d'un extrudeur Lipex thermostaté à 50°C, en un passage à travers une membrane de polycarbonate de porosité 0.8 µm, puis un passage à travers une membrane de porosité 0.4 µm et enfin un passage à travers une membrane de porosité 0.2 µm.

On obtient ainsi des liposomes de DPPC/ER804057/R-848 (4 : 1 : 5.5 mol/mol/mol) en eau à 91 µg/ml de DPPC, 50 µg/ml de ER804057 et 50 µg/ml de R-848.

#### 4. Préparation des compositions vaccinales

- On prépare des compositions vaccinales comprenant à titre d'antigène vaccinal, une protéine recombinante susceptible d'être utilisée dans un vaccin contre le SIDA ; il s'agit de la protéine TAT III B détoxifiée qui est obtenue par expression chez E. coli et purification par différentes étapes de chromatographie, puis inactivation chimique, ainsi que cela est décrit dans la demande WO99/33346, où elle est identifiée sous le terme de Tat carboxyméthylée.

Les compositions sont préparées de la manière décrite ci-après.

Les suspensions liposomales préparées selon les exemples 1 à 3 sont mélangées volume à volume (0.9 ml + 0.9 ml) à une solution de Tat concentrée à 200 µg/ml en tampon

- TRIS 100 mM, NaCl 200 mM, pH 7.4 pour obtenir les préparations (1.8 ml final) dont la composition est indiquée ci-après et dans lesquelles les quantités d'antigènes et d'adjuvant sont indiquées par dose de 200 µl.

1) Tat (20 µg)

- 2) Tat (20 µg) + ER804057/DPPC (5 µg / 9.1 µg soit 3.1 nmoles / 12.4 nmoles)

3) Tat (20 µg) + ER804057/DPPC/R-848 (5 µg / 9.1 µg / 5 µg soit 3.1 nmoles / 12.4 nmoles / 16.7 nmoles)

4) Tat (20 µg) + R-848/DPPC (5 µg / 11.4 µg soit 16.7 nmoles / 15.5 nmoles).

#### 5. Test d'immunisation sur souris.

On dispose de 4 groupes de 6 souris BALB/c femelles âgées de 8 semaines, à qui l'on injecte une des compositions préparées à l'exemple 4, par voie sous-cutanée, à raison d'une dose de 200µl par souris ; les injections sont réalisées à J0 et à J21.

On prélève des échantillons sanguins au sinus retro-orbital à J14 pour l'appréciation de la réponse primaire et à J32 pour la réponse secondaire. La détermination du taux d'IgG1 et d'IgG2a spécifiques est effectuée grâce à des tests ELISA standardisés.

Les souris sont sacrifiées à J37 ; on prélève leur rate et on isole les splénocytes.

5

Les résultats obtenus en ce qui concerne les réponses humorales sont récapitulés dans le tableau ci-dessous et aux Figures 1 à 4, où les taux d'IgG sont exprimés en unités arbitraires ELISA (log10).

Pour chaque groupe de souris, la valeur indiquée dans le tableau est le titre géométrique moyen des valeurs obtenues pour chacune des souris.

10

Composition vaccinale	IgG1 à J14	IgG2a à J14	IgG1 à J32	IgG2a à J32	Rapport IgG1/IgG2a à J32
Tat	1,897	1,000	4,343	2,436	176,2
Tat+ ER804057	2,598	2,820	5,101	4,838	3,5
Tat + R848	2,568	2,959	4,248	4,328	1,3
Tat + ER804057 +R848	2,805	2,864	4,877	4,989	0,9

Le rapport IgG1/IgG2a permet d'apprécier l'orientation de la réponse immunitaire induite. En effet, une réponse de type Th1 se traduit chez la souris par une plus grande proportion d'IgG2a, alors qu'une réponse de type Th2 se traduit par une plus grande proportion d'IgG1.

15

On voit donc que, grâce à la composition selon l'invention, la réponse est orientée vers le type Th1, bien plus fortement que si chacun des immunostimulants était utilisé individuellement.

20

Les graphes représentés sur les figures 1 à 4 permettent de visualiser les réponses obtenues pour chacune des souris, et donc d'apprécier la plus ou moins grande dispersion des résultats. Les performances de la composition selon l'invention sont particulièrement notables au niveau de la réponse en IgG2a obtenue après l'injection de rappel ; en effet, si les niveaux de réponse obtenus avec les compositions ayant un seul immunostimulant, que ce soit le R-848 ou l'ER804057, sont en moyenne satisfaisantes,

25

on remarque que les résultats sont dans ces cas relativement dispersés ; alors qu'avec la composition selon l'invention, toutes les souris ont produit un taux d'IgG2a important.

Cette performance est très importante dans le domaine de la vaccination, où on souhaite toujours protéger l'ensemble des sujets vaccinés, mais où les variabilités généralement observées entre les individus ne permettent pas d'assurer le même bénéfice à chacun des individus recevant le vaccin.

Ces résultats observés en présentant dans une même composition vaccinale un adjuvant comprenant à la fois un agoniste de récepteur Toll-like 4 et un agoniste des récepteurs Toll-like 7 et Toll-like 8, est d'autant plus surprenante que des tests réalisés en

combinant un agoniste des récepteurs Toll-like 7 et Toll-like 8 et un agoniste d'un autre récepteur également présent sur les cellules présentatrices d'antigènes, n'ont pas permis d'améliorer les réponses par rapport aux réponses obtenues en utilisant comme adjuvant chacun des composés séparément.

Pour apprécier l'effet des compositions pharmaceutiques selon l'invention sur la réponse cellulaire, on effectue des comptages des cellules spléniques capables de produire de l'interféron  $\gamma$  par un test ELISPOT. Ce test est réalisé à la fois sur des cellules fraîches et sur des cellules restimulées.

Pour la réalisation du test, on cultive les cellules spléniques dans des plaques de culture cellulaire, à raison de 200 000 cellules par puits, en présence soit du milieu seul, soit de l'antigène TAT recombinante. Après 16 heures de culture, on révèle l'ELISPOT, i.e .

que l'on compte le nombre de spots correspondant aux cellules sécrétant de l'interféron  $\gamma$ . Les résultats obtenus sont résumés dans les tableaux ci-après ; les valeurs indiquées sont les valeurs moyennes (par groupe de souris), des différences calculées pour chaque souris entre le nombre de spots comptés par million de cellules dans les puits ayant de la TAT recombinante et le nombre de spots comptés par million de cellules dans les puits n'ayant que du milieu.

Le tableau ci-après résume les résultats obtenus sur cellules fraîches.

Composition immunostimulante testée	Nombre de spots par millions de cellules.
TAT à 20 µg	7
TAT à 20 µg + R-848	25
TAT à 20 µg + ER804057	53
TAT à 20µg + R-848 + ER804057	110

- 5 Le tableau ci-après résume les résultats obtenus sur cellules restimulées in vitro pendant 7 jours, en présence d'IL2, par un pool de peptides chevauchant couvrant entièrement la séquence de la protéine TAT.

Composition immunostimulante testée	Nombre de spots par millions de cellules.
TAT à 20 µg	33
TAT à 20 µg + R-848	518
TAT à 20 µg + ER804057	488
TAT à 20µg + R-848 + ER804057	1005

- 10 En outre, on réalise en parallèle la mesure par un test ELISA de la sécrétion des cytokines IL5 et de l'interféron  $\gamma$  dans des surnageants de culture comprenant des splénocytes cultivés en présence ou non de TAT recombinante pendant 5 jours. Les résultats obtenus, exprimés en pg/ml sont résumés dans le tableau ci-après :

Composition immunostimulante testée	IL-5	INF- $\gamma$
TAT à 20 µg	2893	7726
TAT à 20 µg + R-848	152	8326
TAT à 20 µg + ER804057	220	3886
TAT à 20µg + R-848 + ER804057	167	13887

Ces résultats montrent l'effet particulièrement intéressant obtenu sur la réponse TH1, grâce aux compositions selon la présente invention.

## 6. Préparation de suspensions de liposomes pour les tests de stimulation de cellules humaines.

On dispose de dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) obtenue chez Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL), et de 4-amino-2-ethoxymethyl- $\alpha$ ,  $\alpha$ , diméthyl-1-H-imidazo[4,5c]quinoléine-1-ethanol (R-848) fourni par la Société InVivogen.

Ces composés se présentent sous forme de poudre.

9.92 mg de DPPC (13.5  $\mu$ moles) additionnés de 1 mg de R-848 (3.38  $\mu$ moles) sont dissous dans 2 ml d'un mélange chloroforme/méthanol 4 : 1 (vol/vol). La solution est séchée dans un ballon en verre à l'aide d'un évaporateur rotatif de manière à laisser un

film lipidique homogène sur les parois du ballon. Ce film est encore séché sous vide poussé pour éliminer toute trace de solvant résiduel puis repris dans 4 ml d'eau à 60°C.

La suspension liposomale résultante est homogénéisée par agitation au vortex, sonication dans un bain à ultrasons puis extrudée séquentiellement, à l'aide d'un

extrudeur Lipex thermostaté à 50°C, en un passage à travers une membrane de polycarbonate de porosité 0.8  $\mu$ m, puis un passage à travers une membrane de porosité 0.4  $\mu$ m et enfin un passage à travers une membrane de porosité 0.2  $\mu$ m.

On obtient ainsi des liposomes de DPPC/R-848 (4:1 mol/mol) en eau à 2.48 mg/ml de DPPC et 250  $\mu$ g/ml de R-848.

On dispose de dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) obtenue chez Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL) et de ER804057 fourni par la Société Eisai.

Ces composés se présentent sous forme de poudre.

19 mg de DPPC (25  $\mu$ moles) additionnés de 11 mg de ER804057 (6.7  $\mu$ moles) sont dissous dans 5ml d'un mélange chloroforme/méthanol 4 : 1 (vol/vol). La solution est

séchée dans un ballon en verre à l'aide d'un évaporateur rotatif de manière à laisser un film lipidique homogène sur les parois du ballon. Ce film est encore séché sous vide poussé pour éliminer toute trace de solvant résiduel puis repris dans 11 ml d'eau à 60°C.

La suspension liposomale résultante est homogénéisée par agitation au vortex, sonication dans un bain à ultrasons puis extrudée séquentiellement, à l'aide d'un

extrudeur Lipex thermostaté à 50°C, en un passage à travers une membrane de polycarbonate de porosité 0.8  $\mu$ m, puis un passage à travers une membrane de porosité 0.4  $\mu$ m et enfin un passage à travers une membrane de porosité 0.2  $\mu$ m.



On obtient ainsi des liposomes de DPPC/ER804057 (4 :1 mol/mol) en eau à 1.72 mg/ml de DPPC et 1mg/ml de ER804057.

### 7. Test de stimulation de cellules humaines in vitro.

5

On évalue pour 4 donneurs indépendants la capacité des compositions selon l'invention à induire la maturation de cellules dendritiques dérivées de monocytes humains in vitro. Les monocytes sont obtenus à partir de cellules mononuclées du sang périphérique et sont cultivés pendant 5-6 jours en présence d'IL4 et de GM-CSF.

10 Ces cellules sont ensuite cultivées pendant 2 jours en présence de l'une des compositions suivantes :

- milieu de culture seul, servant de témoin négatif,
- liposomes R-848/DPPC préparés selon l'exemple 6 et dilués afin d'obtenir 2,96µg/ml de R-848,
- 15 - liposomes ER804057/DPPC préparés selon l'exemple 2 à raison de 0,1µg/ml.
- une combinaison des 2 préparations liposomales

On réalise ensuite une analyse phénotypique en cytométrie de flux, permettant de mesurer l'expression des marqueurs de maturation CD25, CD80 et CD83, ainsi qu'une mesure par ELISA des cytokines (TNF- $\alpha$ , IL6 et IL12p70) sécrétées par ces cellules.

20

Les résultats indiqués dans les tableaux ci-après représentent les moyennes calculées pour les 4 donneurs :

	Pourcentage de cellules exprimant les marqueurs		
	CD25	CD80	CD83
milieu seul	3	12	4
R-848	25	34	19
ER804057	35	46	15
ER804057 + R-848	78	60	33

25

	Quantité de cytokines en pg/ml		
	TNF- $\alpha$	IL 6	IL12p70
milieu seul	61	77	10
R-848	1727	8263	288
ER804057	398	8349	22
ER804057 + R-848	12041	69973	5304

Les résultats obtenus montrent la grande capacité des compositions selon l'invention à induire la sécrétion de cytokines indicatrices d'une réponse orientée TH1, telles que l'IL12p70 ; la synergie obtenue en combinant les 2 produits est remarquable. Les compositions selon l'invention sont donc particulièrement recommandées dans toutes les méthodes de traitement dans lesquelles on cherche à obtenir une réponse du système immunitaire orientée Th1, et notamment tous les cas où il est souhaitable d'induire la sécrétion de l'une des cytokines suivantes : TNF- $\alpha$ , IL-6 ou IL12p70.

**REVENDEICATIONS**

1. Composition immunostimulante comprenant au moins un agoniste des récepteurs Toll-like 7 ou du récepteur Toll-like 8., caractérisée en ce qu'elle comprend en outre un agoniste du récepteur Toll-like 4.

5

2. Composition immunostimulante selon la revendication précédente, caractérisée en ce que l'agoniste du récepteur Toll-like 7 ou du récepteur Toll-like 8 est un composé différent de l'agoniste du récepteur Toll-like 4.

10

3. Composition immunostimulante selon une des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre au moins un antigène vaccinal.

15

4. Composition immunostimulante selon une des revendications précédentes, caractérisée en ce que l'agoniste de récepteur Toll-like 7 est un dérivé d'imidazoquinoléine amine.

20

5. Composition immunostimulante selon la revendication précédente, caractérisée en ce que le dérivé d'imidazoquinoléine amine est le 4-amino-2-ethoxymethyl- $\alpha$ ,  $\alpha$ , dimethyl-1-H-imidazo[4,5c]quinoleine-1-ethanol.

25

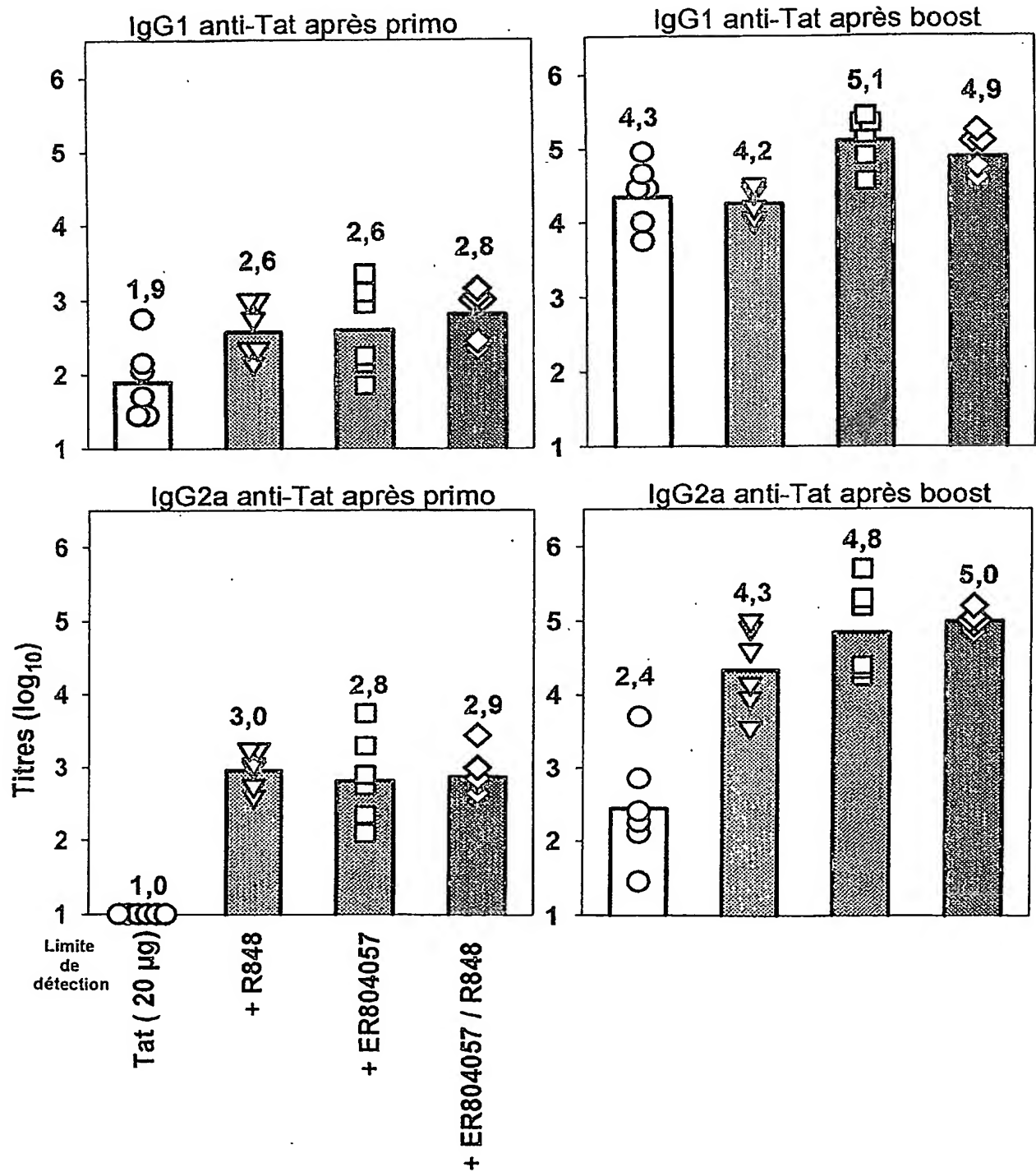
6. Composition immunostimulante selon une des revendications précédentes, caractérisée en ce que l'agoniste du récepteur Toll-like 4 est le ER804057 .

7. Utilisation d'une composition immunostimulante selon une des revendications précédentes, pour la fabrication d'un médicament.

30

8. Utilisation d'une composition immunostimulante selon une des revendications 1 à 6, pour la fabrication d'un médicament susceptible d'induire une réponse immunitaire de type TH1.

## Test F.IV.Tat 010.Ms



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**